

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 01/13115 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543,  
C12Q 1/68

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49A,  
91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02758

(22) Internationales Anmeldedatum:  
12. August 2000 (12.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 38 138.0 16. August 1999 (16.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT  
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN  
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf  
[DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). HAS-  
SMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118a, D-91052  
Erlangen (DE). KOSAK, Hans [DE/DE]; Von-Wit-  
zeleben-Strasse 23, D-53123 Bonn (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR IDENTIFYING A BIOPOLYMER SEQUENCE ON A SOLID SURFACE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR IDENTIFIKATION EINER BIOPOLYMERSEQUENZ AUF  
FESTKÖRPEROBERFLÄCHEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying a biopolymer spread on a first surface of a solid substrate, whereby the first biopolymer is brought into contact with a second biopolymer which spread on a second surface, whereby said second biopolymer has an affinity for the first biopolymer; Biopolymer in Kontakt gebracht wird und wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz, der Leitfähigkeit im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation eines auf einer ersten Oberfläche eines Festkörpersubstrats aufgetragenen ersten Biopolymers, wobei das erste Biopolymer mit einem dazu affinen, zweiten sich auf einer zweiten Oberfläche befindenden Biopolymer in Kontakt gebracht wird und wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz.

WO 01/13115 A2

## Verfahren und Vorrichtung zur Identifikation einer Biopolymersequenz auf Festkörperoberflächen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur  
5 Identifikation einer spezifischen Biopolymersequenz, die auf  
einer Festkörperoberfläche gebunden ist.

Aus der US 5,780,234 ist es bekannt, den Zustand der Hybridisierung durch Änderung der elektrischen Leitfähigkeit nachzuweisen. Dazu ist es nach der Lehre der US 5,780,234 erforderlich, daß ein Transfer von freien Elektronen stattfindet. Zu diesem Zweck sind die Nukleinsäuresequenzen mit Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren kombiniert. Bei einer Hybridisierung kann es zum Ladungstransport kommen. Die Anlagerung des nachzuweisenden Oligonukleotids erfolgt hier aus der Lösung.  
15

Weitere Verfahren zur Identifikation einer Polymersequenz sind bekannt aus der WO 99/29898, US 5,065,798, WO 98/48275, US 5,866,336 sowie WO 99/11813.  
20

Aus H.W. Fink, C. Schönenberger, Nature 398, 407 (1999) ist bekannt, daß die Leitfähigkeit einzelner DNA-Doppelstränge in der Größenordnung guter Halbleiter oder leitfähiger Polymere liegt.  
25

S.O. Kelley, N.M. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38, 941 (1999) offenbaren, daß Monolagen von DNA-Doppelsträngen auf Elektrodenoberflächen eine hohe Leitfähigkeit und einen schnelleren Ladungstransfer auch über  
30 große Abstände aufweisen.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine neue Technologie bereitzustellen, mit der an eine feste Oberfläche fixierte Biopolymere eindeutig, schnell und sensitiv identifiziert werden können.

5

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 7 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 6 und 8 bis 12.

- 10 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifikation eines auf einer ersten Oberfläche eines ersten Substrats aufgebrachtten ersten Biopolymers vorgesehen, wobei das erste Biopolymer mit einem dazu affinen, zweiten sich auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats befindenden Biopolymer in
- 15 Kontakt gebracht wird und wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch affinitätsbedingte Adhäsion bewirkten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit.
- 20 Unter einem Biopolymer wird insbesondere ein aus Nukleotiden oder Aminosäuren gebildetes Polymer verstanden, z.B. DNA, RNA, PNA, PTO, Peptid, Protein u. dgl.. Unter einem affinen Biopolymer wird ein Biopolymer verstanden, das mit einem korrespondierenden Biopolymer eine Bindung eingehen kann. Die
- 25 Bindung kann eine kovalente, ionische oder auf Wasserstoffbrücken beruhende Bindung sein. Auch eine durch sterische Effekte hervorgerufene Bindung kommt in Betracht.

Durch die elektronische Detektion der z.B. bei der Hybridisierung auftretenden Leitfähigkeitsänderung zwischen zwei

30 Oberflächen wird die Sensitivität und Spezifität erhöht sowie apparativer Aufwand herabgesetzt.

Mögliche Einsatzfelder des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen in der medizinischen Diagnostik-, Identifikations-, Codierungs- und Erkennungstechnik.

- 5 Als Änderung kann die Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Stromfrequenz gemessen werden. Dabei kann eine der Oberflächen elektrisch leitfähig sein und die Änderung über diese
- 10 Oberfläche gemessen werden. Die Oberflächen können aber auch durch einen Isolator getrennt werden. Dabei kann das erste und/oder zweite Biopolymer als Schicht auf die Oberfläche aufgebracht sein, wobei darin elektroaktive Metallatome, -
- 15 ionen, -cluster oder Komplexmoleküle eingebracht werden. Nach einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, daß die Bestimmung der Änderung mittels einer Referenzelektrode und/oder einer Gegenelektrode durchgeführt wird.

- Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zur
- 20 Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, wobei auf einer Oberfläche eines ersten Substrats ein erstes Biopolymer derart aufgebracht ist, daß es mit einem dazu affinen, zweiten auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats aufgetragenen Biopolymer in Kontakt bringbar ist, und wobei
- 25 zur Identifikation des ersten Biopolymers eine Einrichtung zur Auswertung einer durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit vorgesehen ist.

- 30 Ausgestaltungen der Erfindung werden im folgenden erläutert. Die erfindungsgemäße Identifikation der Biopolymere auf einer